

Hypothetisches Modell der letzten Papers

Bis dahin bekannt (1997) :

- Induktion der Zellelongation durch Auxin
- Auxin-responsive Gene untereinander hohe Homologie

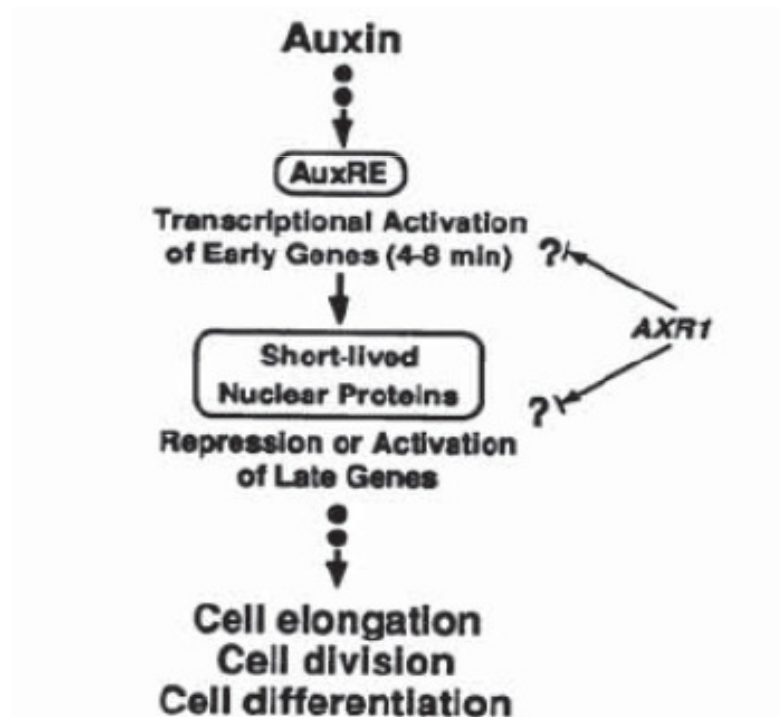
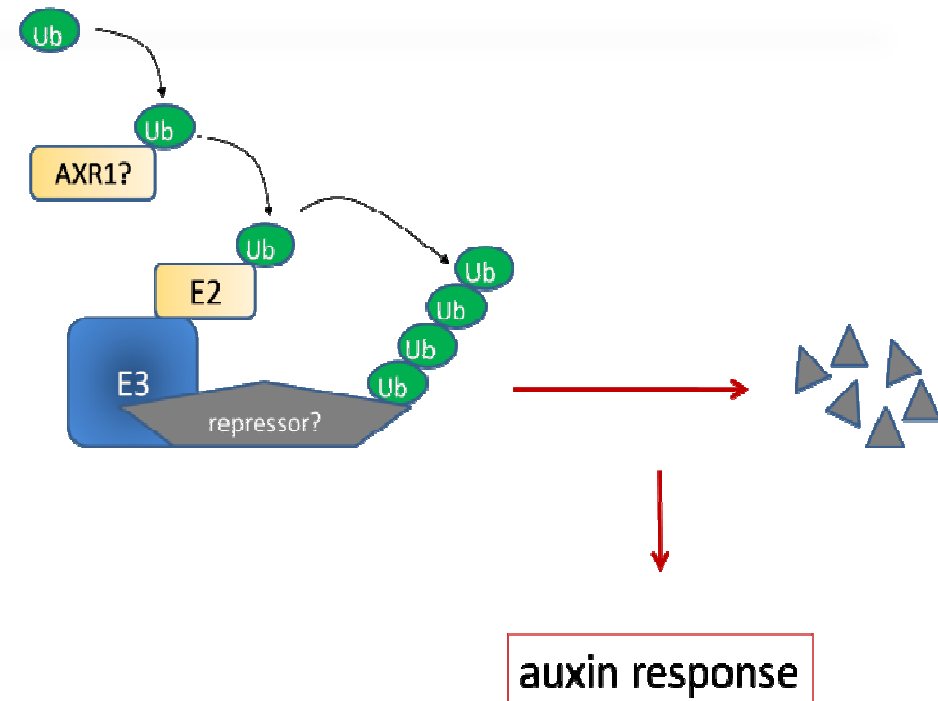


FIG. 5. Model for early auxin events.



- Promotorsequenz für Auxin response in Auxin-induzierten Gene identifiziert = AuxRE
- Frühe Auxin-induzierte Gene verschlüsseln kurzlebige Kernproteine

2.paper

Science (1997)

ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements

Tim Ulmasov, Gretchen Hagen, Tom J. Guilfoyle*

Ziel: weitere Charakterisierung des AuxRE
Identifizierung von Proteinen, die mit AuxRE interagieren

Hintergrund:

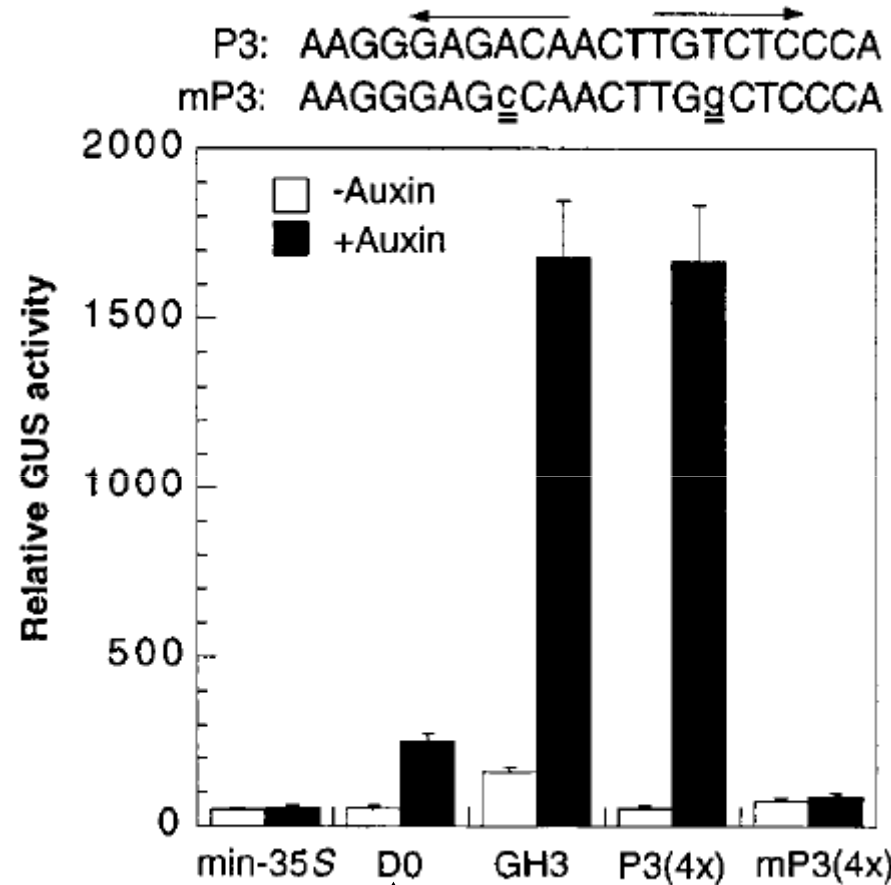
- AuxRE wurde anhand eines anderen Promotors (GH3 aus Sojabohne) als konservierte Sequenz TGTCTC identifiziert
- Motif weist Homologie zu Glucocorticoid Motif (TGTTCT) auf, das i.d.R. als Palindromsequenz (AGAACA_nTTGTTCT) vorliegt

➤ liegen AuxRE auch in Palindromen vor?

quantitativer GUS assay



fluorimetrische
Quantifizierung der
Blaufärbung



Test in
Möhren
Protoplasten

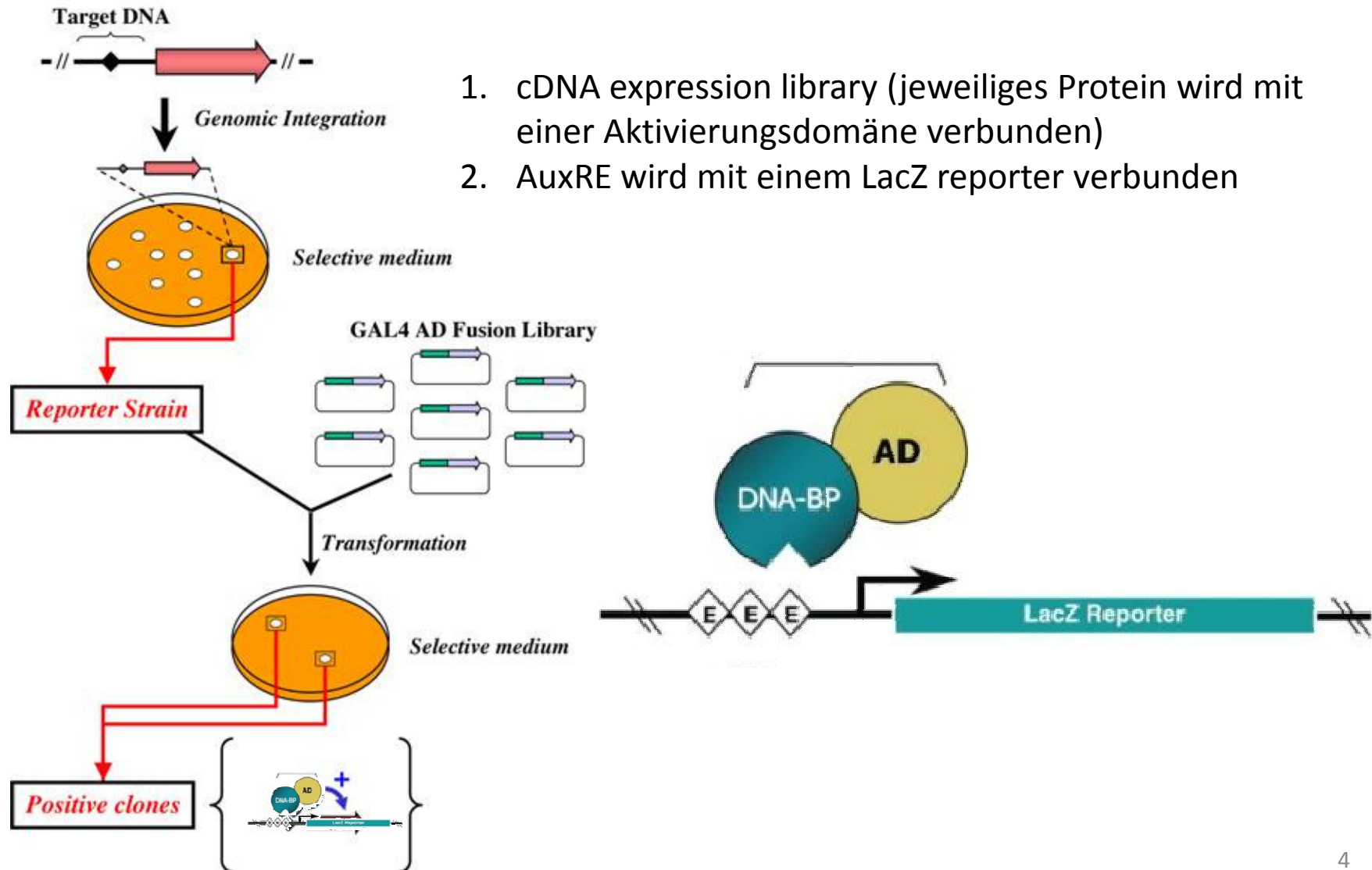
min-35S: minimal Promotor
von cauliflower mosaic virus

D0: eins der zwei
AuxRE des GH3
Promotors

Palindrome sind
bessere responsive
Elemente

Yeast-one-hybrid system

Identifizierung von Proteinen, die an das AuxRE binden können



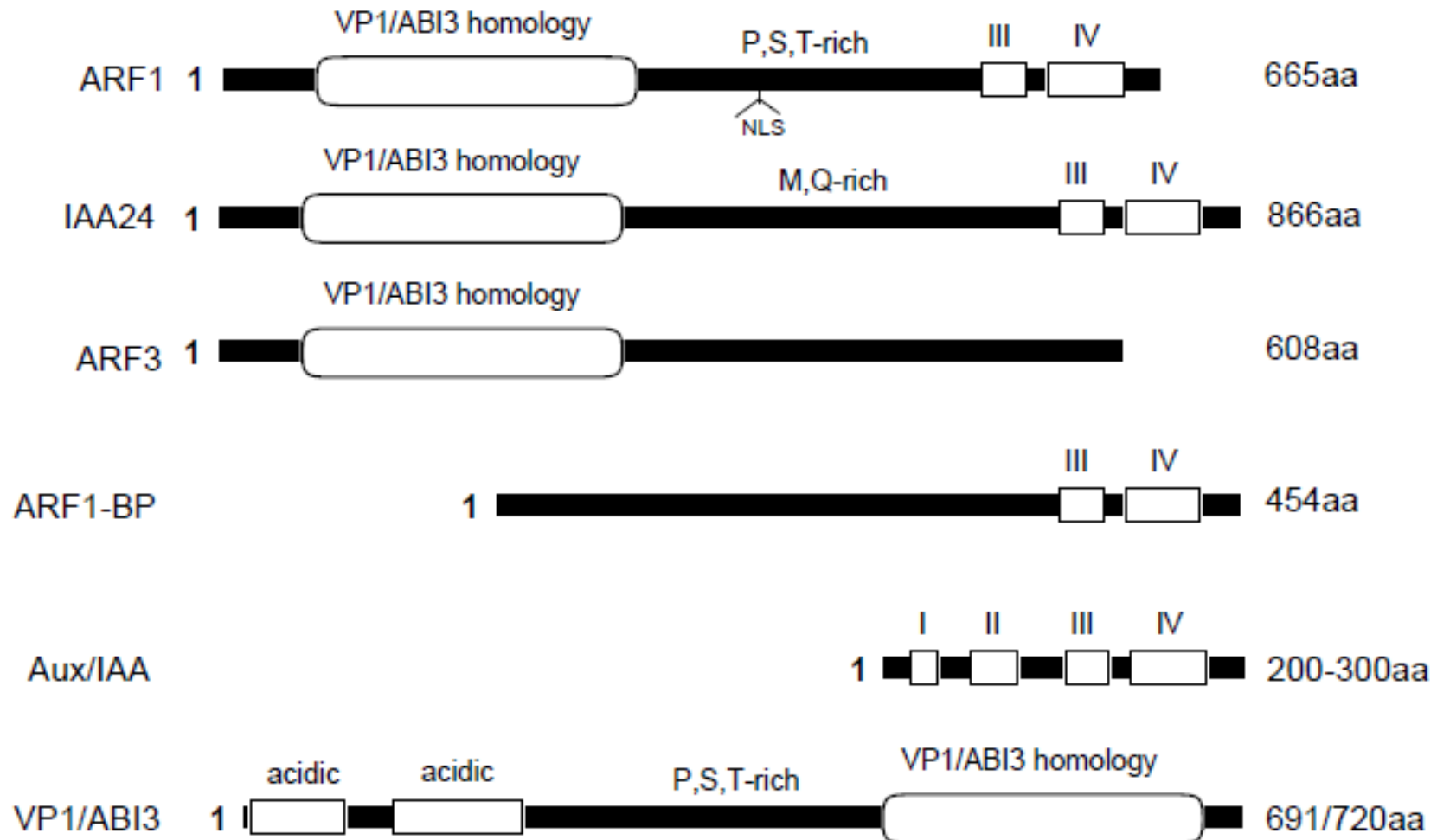
Yeast-one-hybrid screen

5 cDNA Klone wurden identifiziert – alle kodieren für das gleiche Protein: ARF1

A

```
1  MAASNHSSGK PGGVLSDALC RELWHACAGP LVTLPREGER VYYFPEGHME
51  QLEASMHQGL EQQMPSFNLP SKILCKVINI QRRAPETDE VYAQITLLPE
101 LDQSEPTSPD APVQEPEKCT VHSFCKTLTA SDTSTHGGFS VLRRHADDCL
151 PPLDMSQOPP WOELVATDLH NSEWHFRHIF RGOPRRHLLT TGWSVVFVSSK
201 KLVAGDAFIF LRGENEELRV GVRRHMRQOT NIPSSVISSH SMHIGVLATA
251 AHAIITGTIF SVFYKPTRSR SEFIVSVNRY LEAKTQKLSV GMRFKMRFEG
301 EEAPEKRFSG TIVGVQENKS SVWHDSEWRS LKVQWDEPSS VFRPERVSPW
351 ELEPLVANST PSSQPQPPQR NKRPRPPGLP SPATGPSGPV TPDGVWKSPA
401 DTPSSVPLFS PPAKAATFGH GGNKSFGVSI GSAFWPTNAD SAAESFASAF
451 NNESTEKKQT NGNVCRLFGF ELVENNVNDE CFSAAVSUGA VAVDQPVPSN
501 EFDSGQQSEP LNINQSDIPS GSGDPEKSSL RSPQESQSRQ IRSCTKVHMQ
551 GSAVGRAIDL TRSECYEDLF KLEEMFDIK GELLESTKKW OVVYTDEDD
601 MMVGDDPWN EFCGMVRKIF IYTPEEVKKL SPKNKLAVNA RMQLKADAE
651 NGNTEGRSSS MAGSR
```

Struktur der Gene

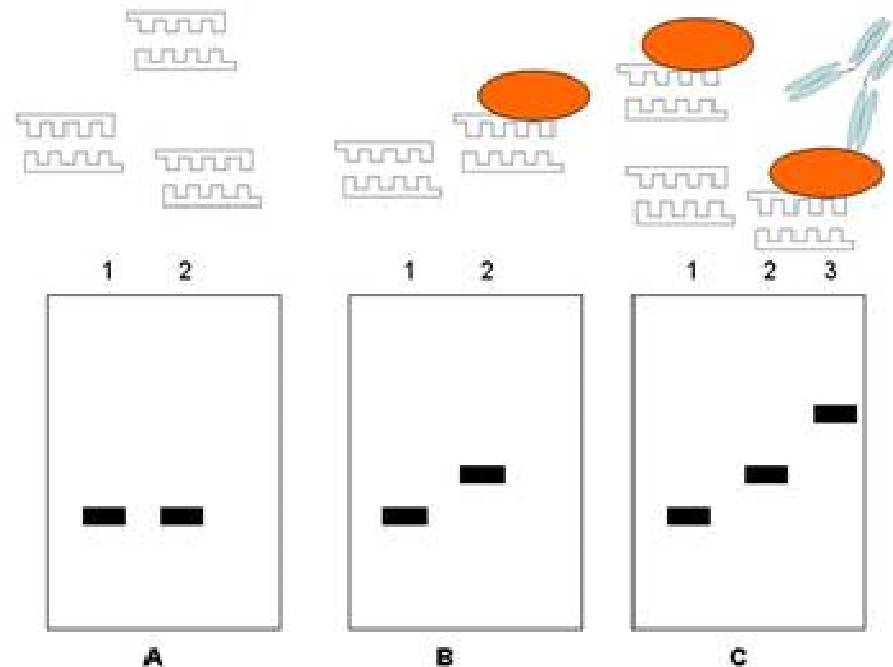


- Homologien in VP1-Region zu Proteinen in Mais → konservierte Proteine
- NLS → Wird in Nucleus transportiert (vermutlich Geninduzierung/-reprimierung)
- Homologien in Box III/IV zu Aux/IAA → mögliche Bindung

gel mobility shift assay

Nachweis der Bindung eines Proteins an DNA

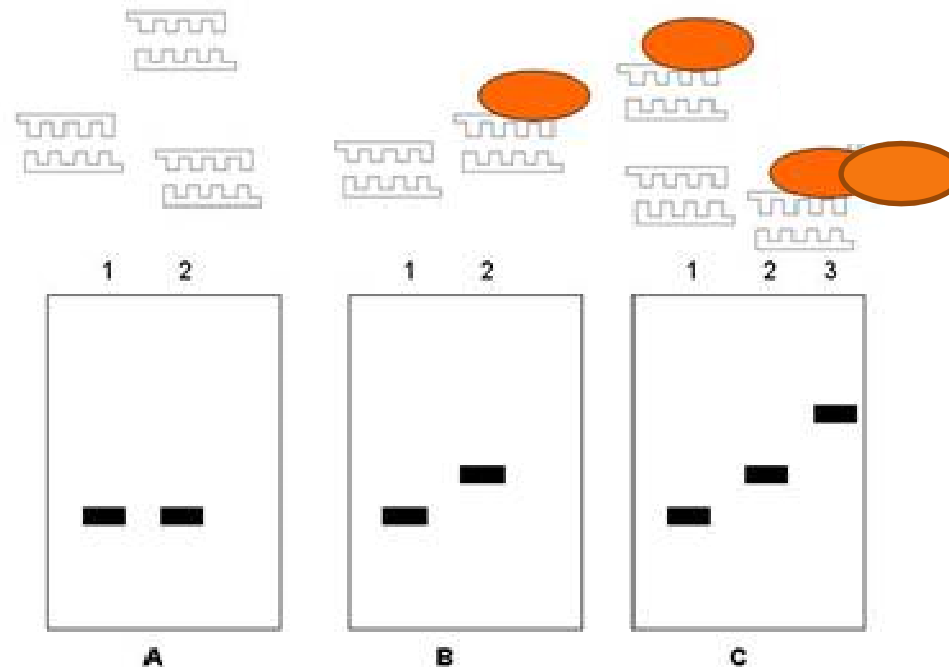
DNA Fragmente an die ein Protein gebunden vorliegt, bewegen sich langsamer im Gel als freie DNA Stücke (im Agarosegel abhängig von der Größe und Ladung des DNA-Protein-Komplexes).



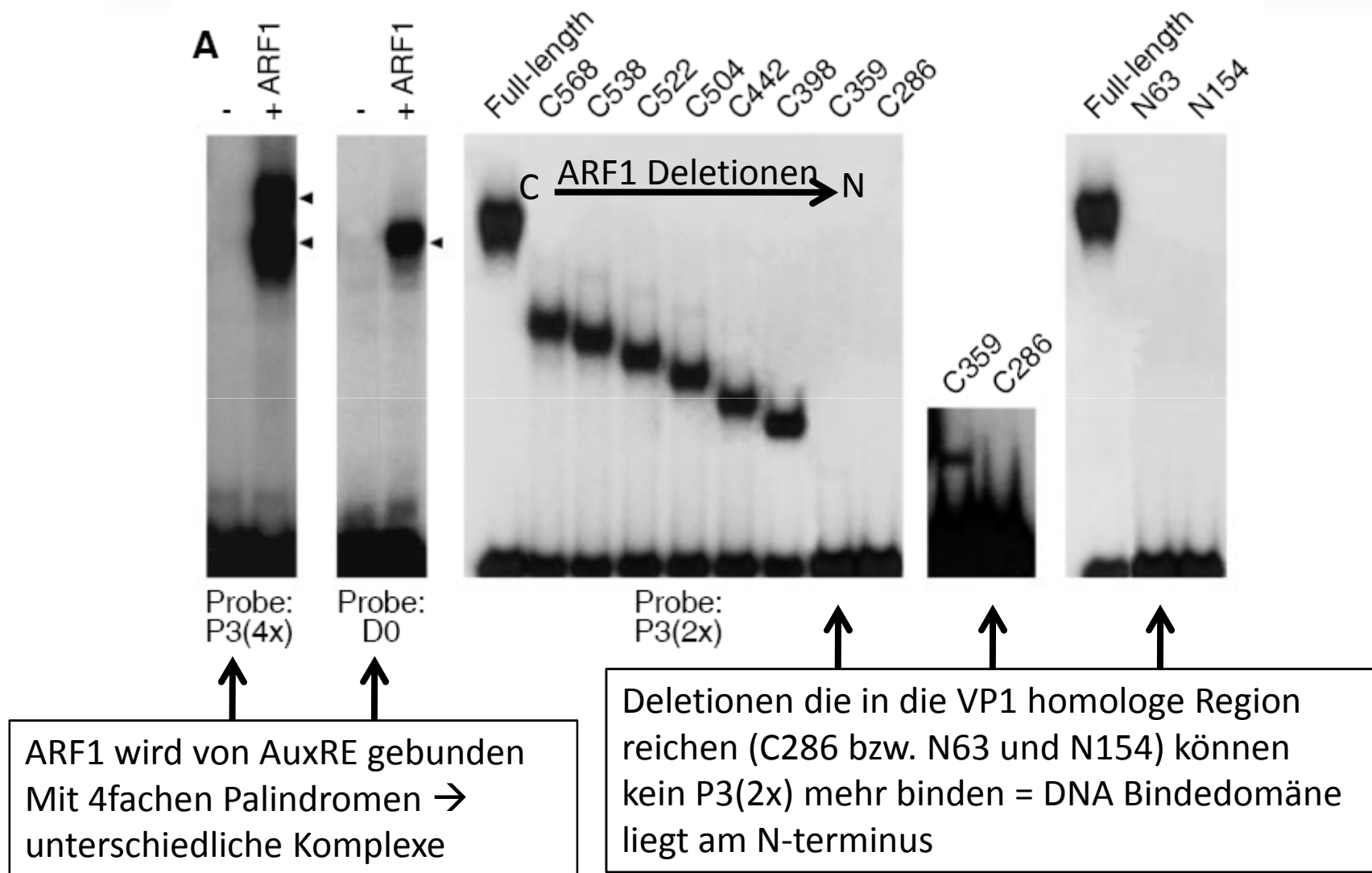
gel mobility shift assay

Nachweis der Bindung eines Proteins an DNA

DNA Fragmente an die ein Protein gebunden vorliegt, bewegen sich langsamer im Gel als freie DNA Stücke (im Agarosegel abhängig von der Größe und Ladung des DNA-Protein-Komplexes).



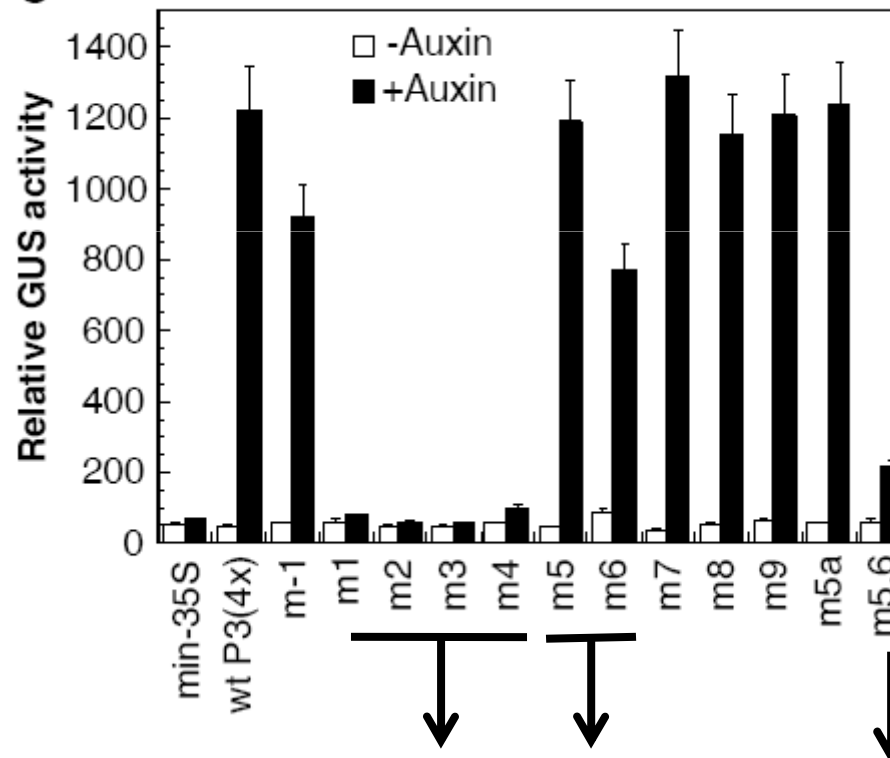
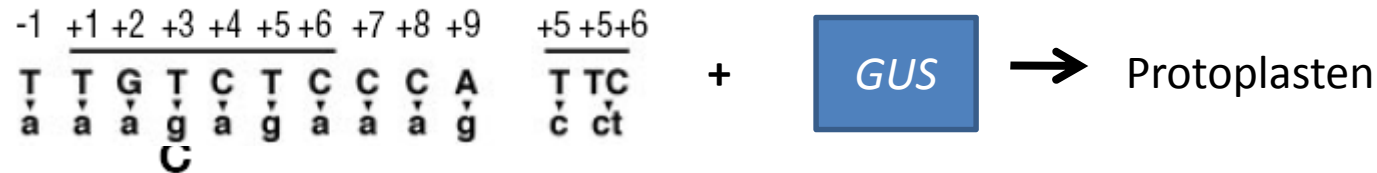
gel mobility shift assay





quantitativer GUS assay

Welche Basen im Motif sind essentiell für die Auxininduktion?



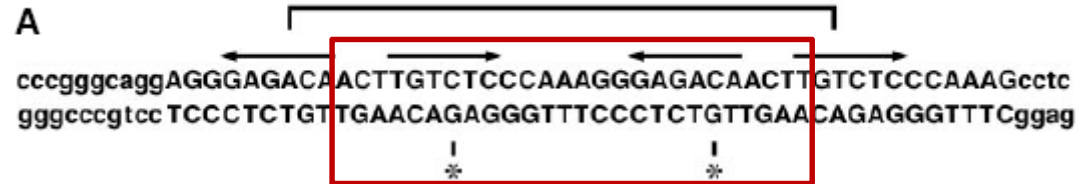
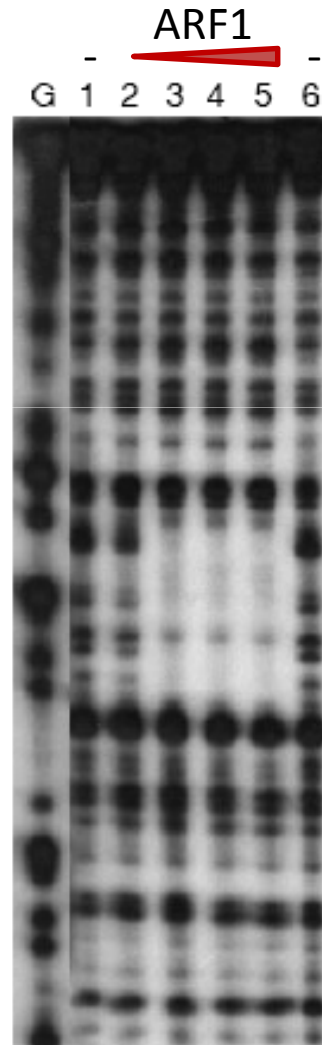
Bp 1-4 essentiell für die Bindung

5 und 6 jeweils fakultativ, jedoch nicht beide gleichzeitig



Struktur der ARF1 Bindestelle

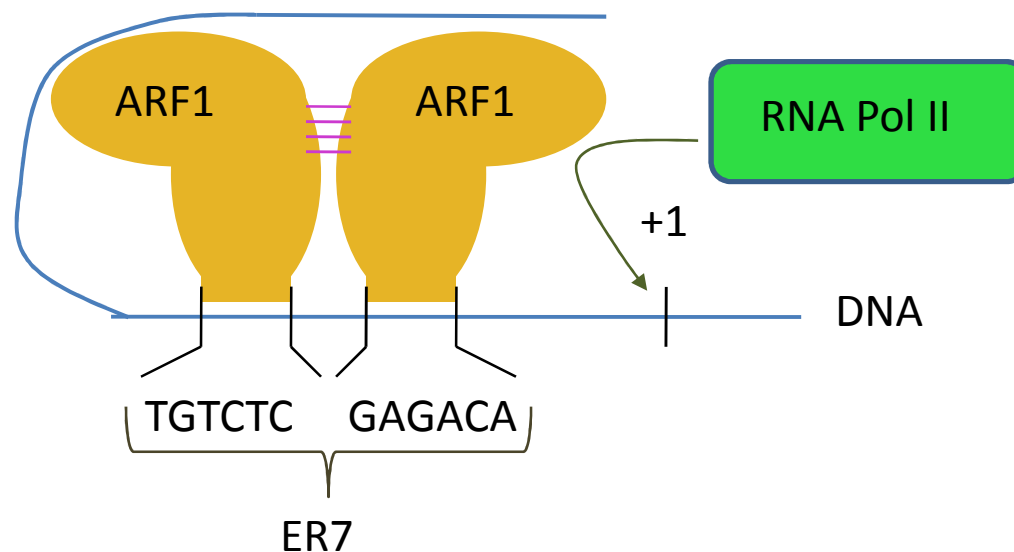
DNase I footprinting
P3(2x)



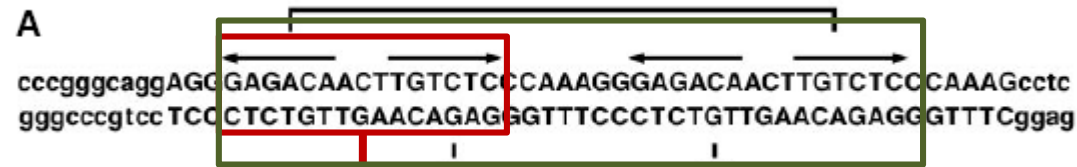
Test mit mobility shift assay



ARF1 bindet scheinbar bevorzugt an den everted repeat
Bereich der Palindromen AuxRE Sequenz



Struktur der ARF1 Bindestelle(n)

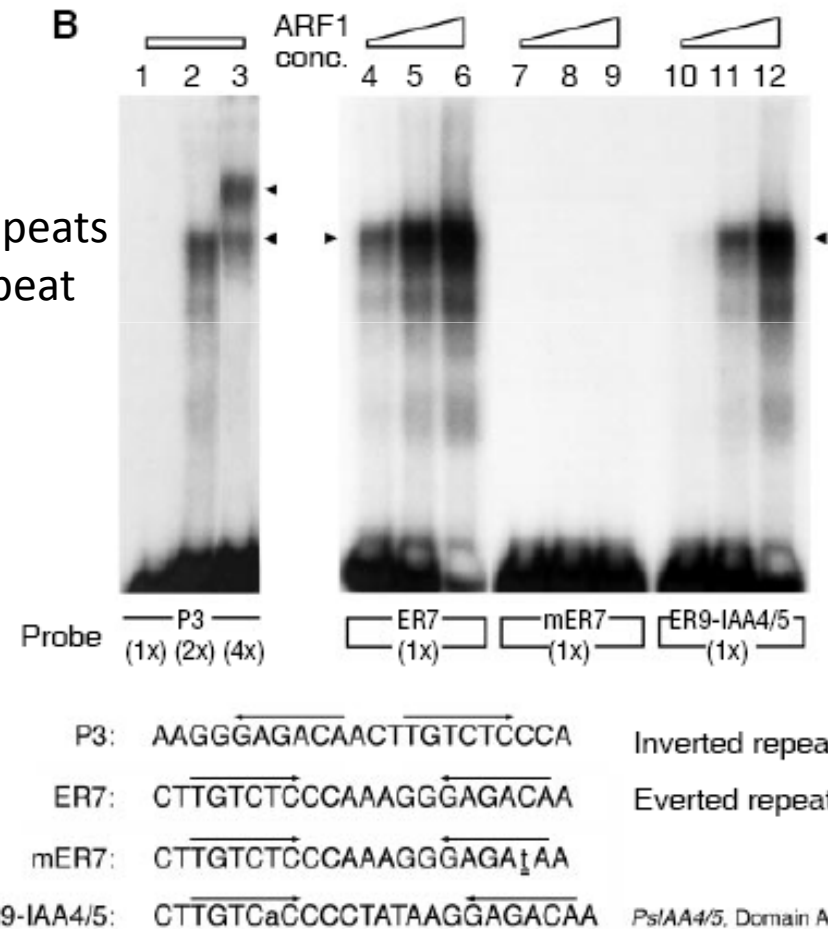


P3 (1x)
= 1 inverted repeat

P3 (2x)
= 2 inverted repeats
1 everted repeat

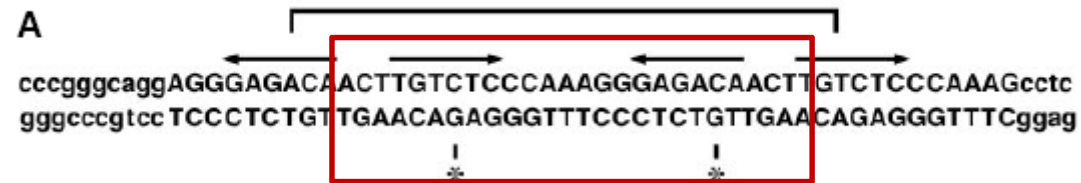
- 1 x IR ist nicht ausreichend für ARF1 Bindung
- 1 x ER kann ARF1 binden
- 2 x ER = 2 ARF1 Komplexe (P3(4x))

→ Wegen der Abstände zwischen den Palindromen wahrscheinlich kein Trimer-, sondern Dimerprotein





Struktur der ARF1 Bindestelle



ARF1 bindet im everted repeat Bereich der Palindromen
AuxRE Sequenz



bei GREs ist der Abstand zwischen den Palindromen
wichtig für die Bindungsaffinität



Auch bei AuxREs?



quantitativer GUS assay

A

cccgggcaggAGGGAGACAACCTTGTCTCCCAAAGGGAGACAACCTTGTCTCCCAAAGcctc
gggcccgctc TCCCTCTGTTGAACAGAGGGTTTCCCTCTGTTGAACAGAGGGTTTCggag

Abstand
0 (ER0) – 9 (ER9)
Basen

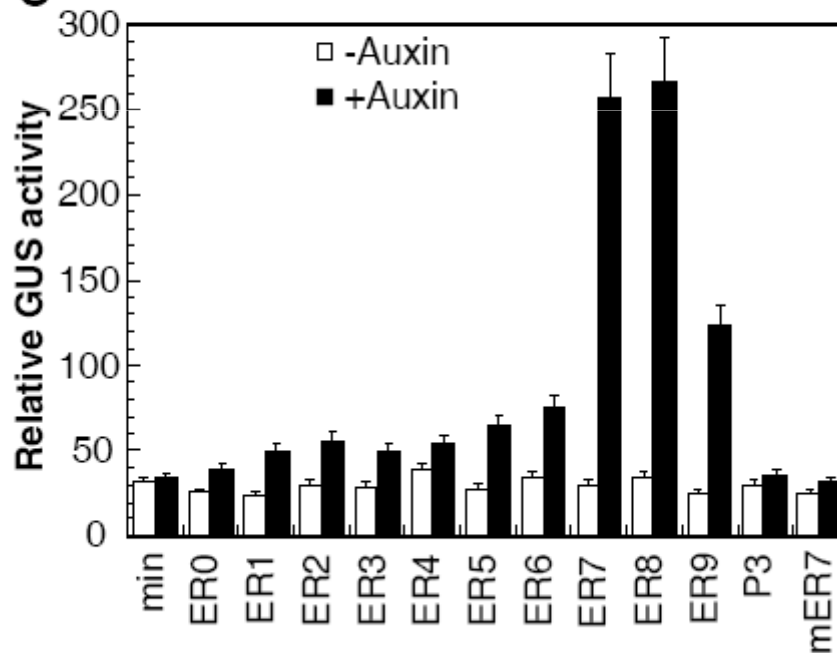
ER Konstrukte +

GUS



Protoplasten

C



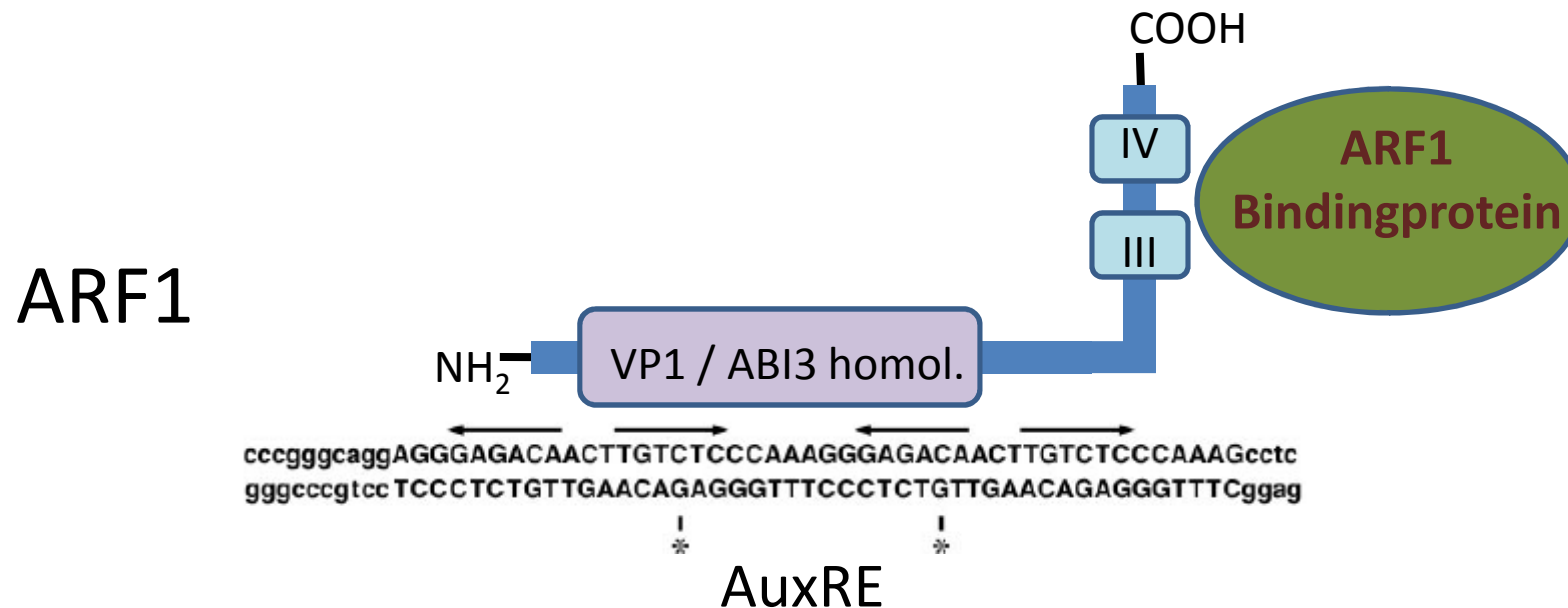
ARF1 ▶



Auxin response ist am stärksten, wenn der Abstand der ERs 7 bis 8 Basen beträgt

ARF1-BP

Durch Yeast-2-Hybrid-System wurden 2 cDNAs isoliert, die für das gleiche Protein kodieren, welches über Box III und IV verfügt
→ ARF1-BP



Fazit

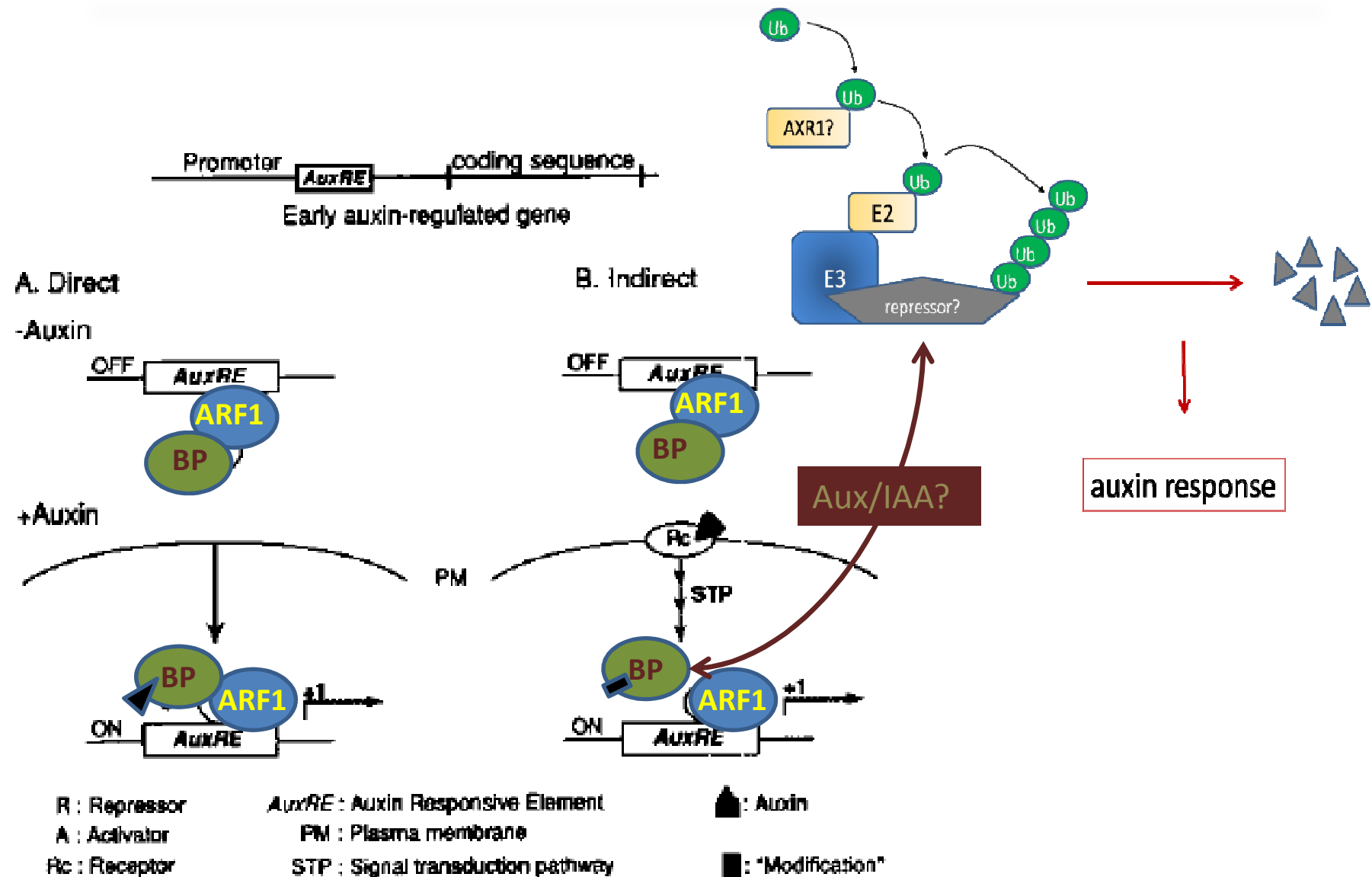
Science (1997)

ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements

Tim Ulmasov, Gretchen Hagen, Tom J. Guilfoyle*

- Transkriptionsfaktor ARF1 wurde identifiziert
- AuxRE wurde näher charakterisiert
- Generelle Bindung von ARF1 an AuxRE wurde charakterisiert
 - everted Palindrom
 - 7 Bp Abstand
 - Dimerbildung wahrscheinlich
- Ein ARF1-BP wurde gefunden
 - Mögliches Aux/IAA (gleiche Box III und IV)

Modelle (1997)





überübernächste Woche:

Peter und Micha:

GENES & DEVELOPMENT 12:198-207 © 1998 by Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/98 \$5.00; www.genesdev.org

The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p

Max Ruegger,¹ Elizabeth Dewey, William M. Gray, Lawrence Hobbie,² Jocelyn Turner, and Mark Estelle³

Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405 USA